

· 实验研究 ·

不同浓度七氟醚对缺血-再灌注心肌单相动作电位影响

王贵龙 高鸿 王子君 易菁 李伟超 刘艳秋

【摘要】 目的 观察不同浓度七氟醚对大鼠离体心脏缺血-再灌注时心肌单相动作电位(MAP)的影响。**方法** 健康成年雄性 SD 大鼠 32 只, 体重 280~320 g, 成功制备 langendorff 离体心脏灌注模型, K-H 液平衡灌注 15 min 后, 随机分为四组, 每组 8 只: 缺血-再灌注组(IR 组); K-H 液继续灌注 15 min 后停止, 注射 Thomas 液(4℃, 20 ml/kg)使心脏停搏 60 min, 心脏周围用低温(4℃) Thomas 液保护, 30 min 时半量复灌 Thomas 液(4℃, 10 ml/kg), 60 min 时再灌注 K-H 液 30 min; 0.5 MAC 七氟醚组(Sev0.5 组): K-H 液为含饱和 0.5 MAC 七氟醚液体, 余同 IR 组; 1.0 MAC 七氟醚组(Sev1.0 组): K-H 液为含饱和 1.0 MAC 七氟醚液体, 余同 IR 组; 2.0 MAC 七氟醚组(Sev2.0 组): K-H 液为含饱和 2.0 MAC 七氟醚液体, 余同 IR 组。记录平衡灌注 15 min(T_0)、继续灌注 15 min(T_1)、再灌注 15 min(T_2)、再灌注 30 min(T_3)的 HR 及左心室前壁外膜层、中层和内膜层心肌 MAP, 计算 MAP 复极 50% 及 90% 的时程(MAPD₅₀、MAPD₉₀)。并记录心律失常发生情况。**结果** 与 T_0 和 T_1 时比较, T_2 、 T_3 时 IR 组、Sev1.0 组、Sev2.0 组 HR 明显减慢($P<0.05$); 与 IR 组比较, T_2 、 T_3 时 Sev0.5 组、Sev1.0 组 HR 明显增快, Sev2.0 组 HR 明显减慢($P<0.05$)。与 IR 组比较, T_3 时 Sev0.5 组 MAPD₅₀, Sev0.5 组、Sev1.0 组、Sev2.0 组 MAPD₉₀ 明显缩短($P<0.05$)。心脏复跳时 IR 组有 6 例, Sev0.5 组有 1 例, Sev1.0 组有 2 例, Sev2.0 组有 1 例发生心律失常, 与 IR 组比较, Sev0.5 组、Sev1.0 组和 Sev2.0 组心律失常发生率明显降低($P<0.05$)。**结论** 不同浓度七氟醚均可缩短缺血-再灌注心肌单相动作电位 MAPD₉₀, 且这一作用在 0.5~2.0 MAC 的七氟醚浓度范围内无剂量依赖性, 这可能是其减少缺血-再灌注心律失常发生风险的机制。

【关键词】 七氟醚; 离体心脏; 缺血-再灌注; 单相动作电位

Effects of different concentrations of sevoflurane on monophasic action potential of myocardium of ischemia-reperfusion WANG Guilong, GAO Hong, WANG Zijun, YI Jing, LI Weichao, LIU Yanqiu. School of Anesthesiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China
Corresponding author: GAO Hong, Email: 2169617@qq.com

【Abstract】 Objective To study the effects of different concentrations of sevoflurane on monophasic action potentials (MAPs) of three-layer myocardium of ischemia reperfusion in isolated rat hearts. **Methods** Thirty-two healthy SD male rats, weighing 280-320 g, were randomly divided into four groups after successful preparation of langendorff isolated heart perfusion model and 15 min perfusion and balance of K-H fluid. In the ischemia-reperfusion group(group IR), K-H fluid perfusion was stopped and balanced for 15 min and cardiac arrest was induced for 60 min with the injection of Thomas solution (4℃, 20 ml/kg) while the heart was protected by the low temperature Thomas solution (4℃) around it. Reperfusion of Thomas solution (4℃, 10 ml/kg) was performed for 30 min and the heart was resuscitated by the perfusion of K-H fluid for 60 min. In the 0.5 MAC sevoflurane group (group Sev0.5), K-H fluid contained 0.5 MAC sevoflurane and other procedures were the same as in group IR. 1.0 MAC sevoflurane group (group Sev1.0), K-H fluid contained 1.0 MAC sevoflurane and other procedures were the same as in group IR. 2.0 MAC sevoflurane group (group Sev2.0), K-H fluid contained 2.0 MAC sevoflurane and other procedures were same as in group IR. HR, MAPs including time course (MAPD₅₀, MAPD₉₀) and MAP amplitude of endocardium, mid-layer myocardium and epicardium was recorded at the time of continuous balance perfusion for 15 min (T_0), continuous perfusion for 15 min (T_1), reperfusion for 15 min (T_2) and 30 min (T_3).

DOI:10.12089/jca.2018.05.015

基金项目:贵阳市科技计划项目(筑科合同[20151001]社 31 号)

作者单位:550004 贵阳市, 贵州医科大学麻醉学院(王贵龙、王子君、易菁、李伟超); 贵州医科大学附属医院麻醉科(高鸿、刘艳秋)

通信作者: 高鸿, Email: 2169617@qq.com

Results Compared with T_0 and T_1 , HR was slower at T_2 and T_3 ($P < 0.05$); Compared with group IR at T_2 and T_3 , HR in group Sev0.5 and group Sev1.0 was higher, that in group Sev2.0 was slower ($P < 0.05$); At T_2 , arrhythmia was observed in 6 rats in group IR, while arrhythmia was observed in 1 rats in group Sev0.5, and arrhythmia was observed in 2 rats in group Sev1.0 and arrhythmia was observed in 1 rats in group Sev2.0; Compared with group IR at T_3 , $MAPD_{50}$ in group Sev0.5 was shorter in three sites ($P < 0.05$); Compared with group IR at T_3 , $MAPD_{90}$ in other three groups was shorter. **Conclusion** Different concentrations of sevoflurane can shorten $MAPD_{90}$ of MAPs, and the effects don't depend on the concentrations of sevoflurane when it changes from 0.5 MAC to 2.0 MAC; which may be the mechanism of decreased arrhythmias risk caused by sevoflurane.

【Key words】 Sevoflurane; Isolated heart; Ischemia-reperfusion; Monophasic action potential

再灌注心律失常(reperfusion arrhythmia, RA)仍然是心肺转流心内直视手术复跳时的主要并发症,是缺血-再灌注损伤的特征性表现之一。早期的 RA 常发生于冠脉开放即刻,持续 10~30 min 不等。并以室早、室速及室颤等心律失常为主^[1]。在心律失常的研究中,心肌细胞单相动作电位(monophasic action potential, MAP)是群细胞心电图向量变化的指标,可直观稳定描述心肌复极时相,特别是反映心肌后除极活动,是观察心肌群细胞电活动的有效手段。通过 MAP 同步记录技术所记录到的动作电位时程与心律失常关系十分密切。有研究表明七氟醚具有减少 RA 发生的作用^[2],本研究预实验表明七氟醚可通过稳定 MAP 而减少 RA 的发生,但这种影响是否与七氟醚浓度有一定相关性未见报道。故本实验拟通过制备大鼠 langendorff 离体心脏低温缺血-再灌注模型,采用心室肌内膜层、中层、外膜层心肌 MAP 同步记录技术,观察不同浓度七氟醚对大鼠缺血-再灌注心肌 MAP 的影响及这种影响是否具有浓度依赖性。

材料与方法

实验动物与分组 健康成年雄性 SD 大鼠 32 只(由贵州医科大学动物实验中心提供),体重 280~320 g,成功制备 langendorff 离体大鼠心脏灌注模型, K-H 液平衡灌注 15 min 后,采用随机数字表法,随机分为四组,每组 8 只:缺血-再灌注组(IR 组)、0.5 MAC 七氟醚组(Sev0.5 组)、1.0 MAC 七氟醚组(Sev1.0 组)和 2.0 MAC 七氟醚组(Sev2.0 组)。

实验方法 腹腔注射 3% 肝素 3 125 U/kg 抗凝和 2% 戊巴比妥钠 60 mg/kg 麻醉。迅速开胸取出心脏,置于 4℃ K-H 液中修剪,充分显露主动脉并插管,连接 langendorff 装置,用 95% O_2 -5% CO_2 混合气体平衡的 K-H 液,在 37℃ 恒温下进行非循

环式逆行灌注,灌注压为 4.0 kPa。心脏复跳后立即于左心室前壁垂直插入参照文献^[3-5]自制的三层心室肌 MAP 复合电极,动作缓慢而轻柔,随时调整电极以确定心室肌三层膜均与电极紧密接触。外膜层电极置于左心室前壁表面,内膜层、中膜层心肌记录电极间距 1 mm,参考电极固定于主动脉根部。各电极导线和信号均输入线连接,使用 BL-420 生物机能实验系统同步记录左心室前壁三层心室肌 50% 和 90% MAP 时程($MAPD_{50}$ 、 $MAPD_{90}$)、0 相最大上升速率(V_{max}), MAP 振幅(MAPA),调节时间常数 3 s,开启 50 Hz 滤波,滤波 1 000 Hz,增益 11 000,振幅 100 mv,扫描速度 250.00 ms/div。IR 组:37℃ K-H 液继续灌注 15 min 后停止,注射 Thomas 液(4℃, 20 ml/kg)使得心脏停搏 60 min,心脏周围用低温(4℃) Thomas 液保护,30 min 时半量复灌 Thomas 液(4℃, 10 ml/kg),60 min 时再灌注 K-H 液 30 min; Sev0.5 组: K-H 液为含饱和 0.5 MAC 七氟醚液体,余同 IR 组; Sev1.0 组: K-H 液为含饱和 1.0 MAC 七氟醚液体,余同 IR 组; Sev2.0 组: K-H 液为含饱和 2.0 MAC 七氟醚液体,余同 IR 组。

观察指标 记录平衡灌注 15 min(T_0)、继续灌注 15 min(T_1)、再灌注 15 min(T_2)、再灌注 30 min(T_3)的 HR 及左心室前壁外、中和内膜层心肌 MAP,计算 $MAPD_{50}$ 和 $MAPD_{90}$,并记录心律失常发生情况。

统计分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量资料的方差分析;计数资料比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

T_0 、 T_1 时四组大鼠 HR 差异无统计学意义。

与 T_0 和 T_1 时比较, T_2 、 T_3 时 IR 组、Sev1.0 组、Sev2.0 组 HR 均明显减慢($P<0.05$); 与 IR 组比较, T_2 、 T_3 时 Sev0.5 组、Sev1.0 组 HR 明显增快, Sev2.0 组 HR 明显减慢($P<0.05$)(表 1)。

四组大鼠三层心肌不同时点 $MAPD_{50}$ 差异无统计学意义; 与 IR 组比较, T_3 时 Sev0.5 组心肌外膜、中膜、内膜 $MAPD_{50}$ 明显缩短($P<0.05$)(表 2)。

四组大鼠三层心肌不同时点 $MAPD_{90}$ 差异无统计学意义; 与 IR 组比较, T_3 时 Sev0.5 组、Sev1.0 组、Sev2.0 组心肌外膜、中膜、内膜 $MAPD_{90}$ 明显缩短($P<0.05$)(表 3)。

四组大鼠三层心肌不同时点 MAPA 和 V_{max} 差异无统计学意义(表 4, 5)。

T_2 时 IR 组有 6 例发生心律失常, 其中 2 例发生室颤, 1 例自动恢复正常节律; Sev0.5 组有 1 例发生心律失常, 且 2 min 内自动恢复正常节律; Sev1.0 组有 2 例发生心律失常, 且 2 min 内自动恢

复正常节律; Sev2.0 组 1 例发生心律失常, 1 例 2 min 内自动恢复正常节律。与 IR 组比较, Sev0.5 组、Sev1.0 组、Sev2.0 组心律失常发生率明显降低($P<0.05$)。

讨 论

与在体心脏缺血-再灌注模型比较, Langendorff 大鼠离体心脏灌注模型的优点为可排除神经、体液等因素对实验结果的影响, 研究结果较为客观, 可以评价麻醉药物对心脏的直接影响。组织和细胞水平的研究也可以阐明心肌细胞电生理的特性, 但不能够真实反映心脏病的病理生理学等改变, 由于相当一部分 RA 只发生于完整的心脏, 所以本研究采用离体心脏为研究对象。

RA 为心肌再灌注损伤的特征性表现, 并以心室肌室性心律失常最常见, 其发生的具体机制尚未完全阐明, 目前认为其电生理机制与后除极和触发

表 1 四组大鼠不同时点 HR 的比较(次/分, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	T_0	T_1	T_2	T_3
IR 组	8	241.00±4.78	240.00±3.51	208.37±4.84 ^{ab}	208.57±2.10 ^{ab}
Sev0.5 组	8	243.12±3.09	241.12±3.09	240.63±5.58 ^c	243.75±7.67 ^c
Sev1.0 组	8	242.55±2.82	244.25±2.12	215.62±2.92 ^{abc}	216.13±2.23 ^{abc}
Sev2.0 组	8	244.88±2.85	242.63±1.84	197.12±4.67 ^{abc}	196.75±6.25 ^{abc}

注: 与 T_0 比较, ^a $P<0.05$; 与 T_1 比较, ^b $P<0.05$; 与 IR 组比较, ^c $P<0.05$

表 2 四组大鼠三层心肌不同时点 $MAPD_{50}$ 的比较(ms, $\bar{x} \pm s$)

部位	组别	只数	T_0	T_1	T_2	T_3
外膜	IR 组	8	17.71±1.95	16.64±2.88	16.06±3.76	17.87±2.38
	Sev0.5 组	8	17.50±3.16	16.22±1.68	16.11±2.56	13.10±2.53 ^a
	Sev1.0 组	8	17.32±3.16	15.08±2.28	17.08±4.24	17.76±2.56
	Sev2.0 组	8	16.00±3.02	15.28±1.92	17.29±5.16	15.38±3.57
中膜	IR 组	8	19.73±1.82	17.01±2.16	15.49±4.07	17.12±2.77
	Sev0.5 组	8	19.24±2.75	17.00±3.86	14.42±3.16	12.55±3.00 ^a
	Sev1.0 组	8	19.17±2.86	15.85±3.05	18.90±3.64	17.89±3.82
	Sev2.0 组	8	19.23±3.42	15.21±3.12	18.63±5.85	14.99±2.93
内膜	IR 组	8	18.80±2.19	16.03±0.73	15.34±3.67	16.00±3.58
	Sev0.5 组	8	18.94±0.96	16.43±4.88	15.33±3.97	12.50±3.94 ^a
	Sev1.0 组	8	18.17±2.86	15.85±3.05	18.90±3.64	17.89±3.82
	Sev2.0 组	8	18.56±2.60	16.36±4.12	18.05±4.19	15.10±1.65

注: 与 IR 组比较, ^a $P<0.05$

表 3 四组大鼠三层心肌不同时点 MAPD₉₀ 的比较 (ms, $\bar{x} \pm s$)

部位	组别	只数	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
外膜	IR 组	8	43.63±2.06	41.35±4.89	40.22±4.30	41.80±4.34
	Sev0.5 组	8	43.21±3.41	44.96±5.32	38.05±3.27	33.10±3.36 ^a
	Sev1.0 组	8	42.26±3.44	36.23±3.08	41.85±2.90	35.67±2.65 ^a
	Sev2.0 组	8	43.27±2.26	39.76±3.66	40.39±5.81	37.66±5.49 ^a
中膜	IR 组	8	40.77±2.47	41.67±2.10	39.16±6.00	40.78±4.11
	Sev0.5 组	8	41.12±1.82	42.30±3.27	35.37±3.96	33.49±5.83 ^a
	Sev1.0 组	8	40.56±5.03	37.40±4.15	42.34±4.43	35.50±4.24 ^a
	Sev2.0 组	8	41.50±2.26	39.16±4.01	42.50±6.95	36.85±4.45 ^a
内膜	IR 组	8	43.33±2.30	43.41±1.66	41.15±2.93	40.33±4.00
	Sev0.5 组	8	41.83±1.09	42.89±5.77	36.74±5.55	32.83±6.14 ^a
	Sev1.0 组	8	43.36±4.63	38.85±4.59	43.29±3.82	35.26±3.85 ^a
	Sev2.0 组	8	43.37±3.41	40.17±5.41	41.87±5.85	37.60±3.80 ^a

注:与 IR 组比较,^a $P<0.05$ 表 4 四组大鼠三层心肌不同时点 MAPA 的比较 (mV, $\bar{x} \pm s$)

部位	组别	只数	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
外膜	IR 组	8	8.30±2.24	7.84±1.37	4.75±1.40	4.08±0.80
	Sev0.5 组	8	8.98±2.46	8.15±2.02	4.61±2.41	4.92±2.61
	Sev1.0 组	8	8.42±2.54	7.84±3.29	4.25±1.67	4.91±2.26
	Sev2.0 组	8	8.66±4.16	7.38±2.10	4.63±2.50	5.16±2.68
中膜	IR 组	8	10.23±3.45	8.55±2.22	5.34±1.54	4.96±2.22
	Sev0.5 组	8	10.10±3.15	8.47±1.93	6.96±1.98	7.01±1.30
	Sev1.0 组	8	9.51±2.75	7.57±1.34	5.19±1.62	6.16±2.21
	Sev2.0 组	8	10.26±3.63	8.18±2.99	6.53±1.93	6.74±1.94
内膜	IR 组	8	9.30±2.89	8.46±1.47	6.49±0.93	5.82±1.16
	Sev0.5 组	8	9.54±1.38	7.79±2.17	6.92±2.85	7.17±0.88
	Sev1.0 组	8	8.81±2.63	7.03±1.06	6.83±1.35	6.44±1.09
	Sev2.0 组	8	10.37±3.27	7.58±2.26	6.73±3.80	6.99±1.61

活动、折返激动、自律性异常、跨室壁负极离散度增加、离子通道异常、细胞间通讯异常等有关,其生化基础多认为与钙超载及氧自由基大量产生有关^[6]。有研究表明七氟醚具有抑制心肌缺血-再灌注损伤的作用^[7],本研究预实验表明七氟醚可通过稳定 MAP 而减少 RA 的发生。

MAP 是群细胞的平均细胞外动作电位,同步记录三层心室肌的 MAP,保证所记录的 MAP

都位于同一跨心室壁层面,能排除区域异质性的影响,除了可判断心肌细胞的去极和复极过程外,还能了解药物对各层心室肌细胞的作用^[8-9],因此本实验通过同步记录缺血-再灌注心肌细胞 MAP 的变化来反映不同浓度七氟醚与再灌注心律失常的关系。

MAPA 和 V_{max} 反映动作电位 0 期 Na⁺ 内流,代表心肌细胞除极。MAPD 则反映动作电位的 0-3

表 5 四组大鼠三层心肌不同时间 Vmax 的比较 (V/s, $\bar{x} \pm s$)

部位	组别	只数	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
外膜	IR 组	8	2.86 ± 1.18	1.79 ± 0.65	1.24 ± 0.45	1.20 ± 0.54
	Sev0.5 组	8	2.07 ± 0.40	1.74 ± 0.47	1.18 ± 0.27	1.24 ± 0.24
	Sev1.0 组	8	2.49 ± 0.82	1.68 ± 0.75	1.36 ± 0.68	1.20 ± 0.68
	Sev2.0 组	8	2.69 ± 0.67	1.53 ± 0.56	1.62 ± 0.74	1.43 ± 0.78
中膜	IR 组	8	2.60 ± 1.02	1.76 ± 0.76	1.14 ± 0.62	1.25 ± 0.37
	Sev0.5 组	8	2.37 ± 0.96	1.89 ± 0.68	1.64 ± 0.64	1.51 ± 0.38
	Sev1.0 组	8	2.02 ± 1.53	1.49 ± 0.38	1.13 ± 0.62	1.37 ± 0.53
	Sev2.0 组	8	2.60 ± 1.30	1.75 ± 0.39	1.42 ± 0.54	1.94 ± 1.41
内膜	IR 组	8	2.99 ± 1.13	2.07 ± 0.82	1.99 ± 0.60	1.24 ± 0.54
	Sev0.5 组	8	1.91 ± 0.63	1.75 ± 0.91	1.77 ± 0.49	1.28 ± 0.57
	Sev1.0 组	8	2.31 ± 1.21	1.90 ± 0.69	1.81 ± 0.93	1.30 ± 0.71
	Sev2.0 组	8	2.76 ± 0.93	1.86 ± 0.77	1.77 ± 1.37	1.50 ± 0.67

相, 其与 Ca^{2+} 内流、 K^{+} 外流等有关, 反映心肌细胞复极。MAPD₅₀ 反映动作电位 2 相, 该期形成的主要原因是 Ca^{2+} 内流与 K^{+} 外流, 主要涉及 L 型钙电流 ($I_{\text{Ca-L}}$)、内向整流钾电流快激活成分 (I_{kr}) 及内向整流钾电流慢激活成分 (I_{ks})。MAPD₉₀ 主要反映复极 3 相, 该期的形成与 K^{+} 外流有关, 主要涉及 I_{kr} 和 I_{ks} [10]。本研究结果表明, 七氟醚对心室肌除极无明显影响, 但可缩短复极 MAPD₉₀, 且不同浓度七氟醚均可减少缺血-再灌注心律失常的发生, 表明七氟醚对缺血-再灌注心肌电生理有明显的抑制效应, 同时起到保护缺血-再灌注心肌损伤的作用。这可能与 K^{+} 外流有关, 但其具体的离子通道电流变化情况有待膜片钳进一步验证。

综上所述, 七氟醚可通过缩短缺血-再灌注心肌 MAPD₉₀, 从而减少缺血-再灌注心律失常发生的风险, 但这种影响与在 0.5~2.0 MAC 七氟醚浓度范围内无剂量依赖性。所以推荐临床上使用低浓度七氟醚, 即可预防低温缺血-再灌注性心律失常的发生。

参 考 文 献

- [1] 董丽, 高鸿, 刘艳秋, 等. 不同浓度异丙酚对离体兔心电动作电位的影响. 贵阳医学院学报, 2015, 40(7): 680-682.
- [2] Gong J, Yao Y, Fang N, et al. Sevoflurane postconditioning

attenuates reperfusion-induced ventricular arrhythmias in isolated rat hearts exposed to ischemia/reperfusion injury. Mol Biol Rep, 2012, 39(6): 6417-6425.

- [3] 姚青海, 崔长琮, 李强, 等. 单相动作电位同步记录电极的建立和应用. 西安交通大学学报(医学版), 2005, 26(01): 89-92.
- [4] 欧阳非凡, 宋有城. 单相动作电位的临床应用. 国外医学: 心血管病分册, 1991(3): 133-138.
- [5] 李洪, 马杰, 肖建民, 等. 应用自制复合电极同步记录兔左心室游离壁三层心肌的单相动作电位. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2003, 17(2): 65-68.
- [6] Tse G, Yan BP, Chan YW, et al. Reactive oxygen species, endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction: the link with cardiac arrhythmogenesis. Frontiers in physiology, 2016, 7(230): 313.
- [7] Gong JS, Yao YT, Fang NX, et al. Sevoflurane postconditioning alleviates action potential duration shortening and L-type calcium current suppression induced by ischemia/reperfusion injury in rat epicardial myocytes. Chin Med J (Engl), 2012, 125(19): 3485-3491.
- [8] Tse G, Wong ST, Tse V, et al. Monophasic action potential recordings: which is the recording electrode? J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2016, 27(5): 457-462.
- [9] Grant AO. Cardiac ion channels. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2009, 2(2): 185-194.
- [10] 顾春英. 心肌细胞离子通道与生物电活动. 心电图杂志, 2013(2): 118-121.

(收稿日期: 2017-11-13)